

Review

**PENGUNAAN *PARTENOGENETIK EMBRYONIC STEM CELLS*
DALAM TERAPI PENYAKIT KELAINAN KATUP JANTUNG**

Oleh :

Diah Nugrahani Pristihadi

199110092020122006



**DEPARTEMEN ANATOMI, FISILOGI, DAN FARMAKOLOGI
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2023**

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Katup jantung merupakan salah satu bagian penting dalam sistem sirkulasi tubuh. Katup jantung berperan sebagai pintu masuk atau keluar darah dari ruang jantung, pengatur arah aliran darah, pengatur perbedaan tekanan antar ruang jantung, dan pengatur jumlah darah yang berada di dalam ruang jantung. Kelainan katup jantung menjadi masalah serius dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Kejadian kelainan katup jantung dilaporkan mencapai 20 – 30% akibat malformasi kongenital dan ditemukan terjadi pada 5% bayi di seluruh dunia (Combs dan Yutzey 2009). Malformasi katup dapat berbentuk stenosis (katup tidak berhasil untuk membuka dengan sempurna), regurgitasi (katup tidak mampu menutup dengan sempurna), atau bahkan atresia (tidak terjadi pembentukan katup) (Bass 2015).

Kejadian kelainan penyakit jantung tidak saja terjadi pada usia muda, tetapi juga pada pasien tua akibat adanya penurunan fungsi tubuh. Kelainan katup jantung lebih sering terjadi pada katup semilunar aorta dan katup mitral dibanding katup lain (Lung dan Vahanian 2014). Golden standar penanganan kelainan katup jantung adalah bedah penggantian katup jantung. Teknik ini dilakukan sebagai solusi penggantian fungsi katup yang sudah mengalami penurunan. Metode ini masih mempunyai banyak kekurangan, antara lain pasien harus selalu mendapatkan terapi antikoagulan dan terdapat kemungkinan bedah lanjutan akibat keterbatasan daya tahan katup sintesis (Schoen dan Levy 2005).

Salah satu solusi yang sekarang tengah banyak dikembangkan adalah penggunaan biomaterial sebagai media terapi penyakit degeneratif, termasuk di dalamnya kelainan katup jantung. Penggunaan material biologis dalam terapi penyakit kelainan katup jantung diharapkan mampu untuk memenuhi standar terapi yang lebih baik daripada katup sintesis. Material biologis seperti stem sel diduga menjanjikan hasil terapi yang lebih baik karena kapasitas pertumbuhannya yang dapat menyesuaikan luasan katup jantung, mampu berdiferensiasi menjadi bagian katup jantung, berpotensi sebagai pendukung katup jantung yang telah mengalami kerusakan, dan diharapkan mempunyai daya tahan yang lebih baik (MacGrogan *et al.* 2015).

Stem sel didefinisikan sebagai sel yang belum mengalami diferensiasi dan mempunyai potensi yang sangat tinggi untuk berkembang menjadi seluruh sel tubuh (Jurkowski *et al.* 2002). Stem sel dapat berasal dari embrio (*embryonic stem cells* atau ESC) dan sel dewasa yang di-*reprogramming* (*adult stem cells*).

Stem sel asal embrio memanfaatkan sel-sel penyusun embrio yang masih bersifat pluripoten. ESC diperoleh dengan melakukan kultur *inner cell mass* (ICM) pada masa blastosis. Sel yang diperoleh dari ICM dapat diubah menjadi seluruh sel tubuh dengan memberikan kondisi tertentu pada medium kultur. Kelebihan ESC adalah mempunyai kemampuan memperbarui diri yang lebih baik dengan kemampuan diferensiasi yang lebih luas (Barfoot *et al.* 2009). Kelemahan penggunaan ESC dalam terapi penyakit degeneratif adalah regulasi etik. Embrio yang digunakan sebagai sumber stem sel

adalah embrio yang sama dengan bakal penyusun seorang individu (Sivaraman dan Noor 2015). Hal tersebut menyebabkan penelitian ESC di beberapa negara seperti Austria, German, dan Italia tidak diperbolehkan. Negara lain seperti Amerika Serikat memperbolehkan praktik ESCs dengan alasan menggunakan sisa embrio hasil in vitro fertilization yang tidak dapat lagi ditransfer ke ibunya (Jurkowski *et al.* 2002; Mehta *et al* 2014).

Adult stem cells adalah stem sel yang masih dapat ditemui pada tubuh makhluk hidup dewasa yang berfungsi sebagai material pengganti saat dibutuhkan (Barfoot *et al.* 2009). Material ini telah terspesialisasi, sehingga penggunaannya sebagai sumber stem sel menghasilkan rentang diferensiasi sel yang lebih sempit. Kelemahan lain dari jenis stem sel ini adalah keberadaannya pada jaringan terbatas jumlahnya dan sulit untuk diisolasi, serta hasil isolasinya sulit untuk dipelihara dalam lingkungan laboratorium (Jurkowski *et al.* 2002). Meskipun belum ada batasan etik penggunaan *adult stem cells*, ketakutan terhadap potensi perubahan genetik yang tersimpan dalam sel selama masa pertumbuhan donor menyebabkan *adult stem cells* kurang begitu diminati penggunaannya.

Salah satu sumber stem sel dan mempunyai potensi yang baik untuk dikembangkan menjadi biomaterial terapi penyakit kelainan katup jantung adalah *parthenogenetik embryonic stem cell* (pESCs). Seperti namanya, material ini berasal dari embrio yang dikembangkan dari satu gamet (maternal saja). Keberadaan pESCs diduga menjadi alternatif sumber stem sel yang baik. Stem sel asal pESCs mempunyai sifat diferensiasi yang hampir sama dengan ESCs (Jurkowski *et al.* 2002). Embrio pESCs tidak dibatasi oleh etika. Secara normal, pESCs tidak mampu melakukan implantasi karena adanya defek gen pengode implantasi (Newman-Smith dan Werb 1995). Oleh karena itu, secara normal pESCs bukan calon individu baru.

Pembentukan pESCs sebagai biomaterial terapi kelainan katup jantung adalah tantangan ke depan yang perlu dipecahkan. Pencapaian hal tersebut harus diawali dengan pemahaman 1) proses aktivasi oosit sebagai bekal pembentukan embrio partenogenetik, 2) proses kultur sel dari embrio partenogenetik, 3) tindakan evaluasi yang perlu dilakukan untuk memastikan sel yang diperoleh masih berada dalam status pluripoten, dan 4) pengetahuan tentang penelitian sebelumnya mengenai penggunaan stem sel dalam terapi kelainan katup jantung. Keempat materi tersebut akan menjadi bahasan tulisan ini.

Tujuan Penulisan

Tujuan penulisan makalah ini adalah menyajikan rangkuman informasi kemajuan perkembangan penggunaan embrio partenogenetik sebagai sumber stem sel. Hasil penulisan ini diharapkan mampu menjadi sumber bekal pemikiran awal untuk melakukan penelitian di bidang pESCs terutama dalam terapi kelainan katup jantung.

PEMBAHASAN

Proses Fertilisasi Natural sebagai Model Pembentukan Embrio Partenogenetik

Fertilisasi merupakan serangkaian proses reproduksi yang memungkinkan terjadi pertemuan gamet jantan dan betina untuk mengembalikan ploidi genetik menjadi $2n$. Fertilisasi melibatkan proses *programming* secara kompleks yang diperlukan dalam pengaturan proses biologi selanjutnya.

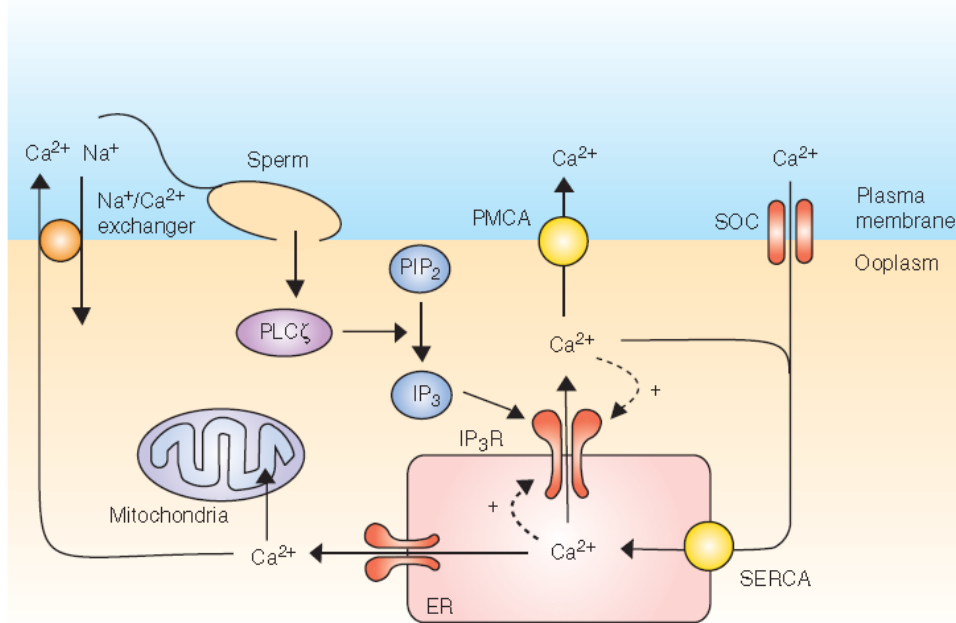
Fertilisasi melibatkan dua gamet, yaitu oosit dan spermatozoa. Spermatozoa merupakan sel gamet jantan yang dihasilkan melalui proses pembelahan meiosis progenitor sel gamet (spermatogenesis) yang kemudian dilanjutkan dengan perubahan morfologi menjadi sel menjadi motil (spermiogenesis) (Griswold 2016). Spermatozoa yang baru saja diproduksi di dalam tubulus seminiferi tidak dapat langsung membuahi oosit. Spermatozoa perlu mengalami hiperaktivasi, kemotaksis, kapasitas, dan reaksi akrosom, dimana setiap proses tersebut terjadi kenaikan konsentrasi kalsium dalam sel spermatozoa (Abou-haila dan Tulsiani 2009; Rahman *et al.* 2014). Kenaikan kalsium dalam sitoplasma spermatozoa berperan penting terhadap induksi kematangan material untuk meningkatkan kemampuan motilitas, fertilisasi, dan pembentukan embrio (Boni *et al.* 2007).

Proses persiapan gamet betina melibatkan proses yang lebih kompleks. Perkembangan gamet betina terjadi sejak masa embrional. Saat hewan lahir, ovarium berada dalam fase inaktif tetapi sudah dilengkapi dengan oosit primer (Mac Lennan *et al.* 2015). Induksi oleh *follicle stimulating hormone* menyebabkan oosit diovulasikan dalam fase Metafase II. Untuk memungkinkan terjadi fertilisasi, oosit dalam fase dormansi ini perlu diaktivasi. Aktivasi oosit juga dilaporkan terkait dengan kenaikan kalsium intrasel (O'Day 2010; Wakai *et al.* 2011; Tokmakov *et al.* 2014).

Kenaikan konsentrasi kalsium dalam sel telur terjadi karena adanya ikatan spermatozoa di zona pelusida (ZP) 3 sel telur (Wassarman *et al.* 2001). Gambar mekanisme molekular fertilisasi disajikan pada Gambar 1. Ikatan spermatozoa di reseptor ZP 3 menyebabkan perubahan struktur zona pelusida sehingga terjadi pencegahan polispermia dan teraktivasinya protein kinase C (O'Day 2010; Yaste *et al.* 2016). Aktivasi protein kinase C menyebabkan perubahan fosfatidil inositol bifosfat menjadi inositol trifosfat dan diasil gliserol. Ikatan inositol trifosfat dengan reseptornya menyebabkan pengeluaran kalsium dari retikulum endoplasma dan peningkatan pemasukan kalsium dari ekstrasel. Kondisi ini menyebabkan peningkatan kalsium di dalam sel.

Proses aktivasi oosit dilakukan dengan menghilangkan faktor dormansi yang sangat tinggi konsentrasinya di dalam sitoplasma sel telur. Maturation promoting factor (MPF) merupakan salah satu faktor penyebab terhentinya siklus sel dalam fase metafase. Keberadaan molekul MPF seperti cyclin B dan securin menginduksi penahanan kromosom di bagian ekuator sel (Jones 2003). Peningkatan konsentrasi kalsium menyebabkan peningkatan molekul polyubiquination dan mendegradasi

intraselular cyclin B (Madgwick *et al.* 2004; Jones 2005). Polyquination adalah salah satu molekul anaphase promoting complex. Peningkatan molekul menyebabkan siklus sel memasuki fase anafase.



Gambar 2 Reaksi peningkatan kalsium intrasel akibat penempelan spermatozoa pada zona pelusida oosit (Sumber: O'Day 2010)

Selain polyquination, proses anafase juga diinduksi oleh pembatasan jumlah protein *endogenous meiotic inhibitor* tipe 2 (Emi2) (Wakai *et al.* 2011; Miao *et al.* 2012). Kenaikan konsentrasi kalsium intra sel menyebabkan pengikatan calmodulin oleh kalsium dependent protein kinase II membentuk Ca-CaMKII. Pembentukan Ca-CaMKII menyebabkan degradasi Emi2 dan menginisiasi proses anafase oosit. Pengaruh lain yang muncul akibat kemunculan Ca-CaMKII adalah terjadinya rotasi benang-benang spindel kromosom yang kemudian menginduksi terjadinya ekstrusi badan polar (Miao *et al.* 2012).

Selain berpengaruh terhadap kemunculan Ca-CaMKII, kenaikan kalsium diduga menyebabkan penurunan jumlah *mitogen activated protein kinase* (Jones 2007; Miao *et al.* 2012). Penurunan MAPK menyebabkan terjadinya pembentukan pronukleus jantan dan betina. Proses fusi pronukleus jantan dan betina diduga diatur oleh cdk 1 (*cycline dependent kinase 1*), meskipun mekanisme kenaikan cdk 1 dalam ooplasm belum diketahui (Tachibana *et al.* 2008).

Pembentukan embrio partenogenetik dilakukan dengan menggunakan mekanisme natural fertilisasi. Terdapat dua dasar pemikiran pembentukan embrio partenogenetik berdasar proses tersebut, yaitu inisiasi kenaikan kalsium intra sel dan

penurunan konsentrasi MPF di dalam ooplasma (Cevik *et al.* 2009). Beberapa cara yang dilaporkan dapat meningkatkan konsentrasi kalsium intraseluler adalah dengan pemberian strontium, ionomycin, induksi listrik, atau etanol pada media kultur (Kharche dan Birade 2013). Beberapa sediaan yang diduga dapat menurunkan MPF dalam ooplasma adalah 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), cycloheximide, dan senyawa antioksidan (Fulka *et al.* 1991; Tarin *et al.* 2002; Marques *et al.* 2011).

Strontium klorida merupakan salah satu sediaan yang dilaporkan mampu menginduksi peningkatan kalsium intraseluler pada oosit muda, matang, atau tua pada mencit (Tomashov-matar *et al.* 2005). Stronsium dilaporkan mampu meningkatkan konsentrasi kalsium intraseluler dengan dua cara, yaitu dengan meningkatkan kerja InsP3 dalam mengeluarkan kalsium dari depo intrasel (Meo *et al.* 2004). Etanol mampu mengaktifasi peningkatan kalsium ooplasma dengan cara meningkatkan kalsium dari ekstra dan intrasel (Meo *et al.* 2004). Etanol mampu menginduksi pembentukan inositol 1,4,5-tri fosfat (IP3) pada plasma membran sehingga terjadi pembukaan kanal kalsium dalam membran oosit dan juga meningkatkan sekresi kalsium dari depo intrasel (Kharche dan Birade 2013). Meski demikian, Tomashov-matar *et al.* (2005) menganggap bahwa ethanol meningkatkan kalsium ooplasma dengan satu cara saja, yaitu dengan pengeluaran kalsium dari depo internalnya saja, seperti mekanisme kerja ionomisin. Mekanisme peningkatan kalsium intraseluler melalui pemberian aliran listrik adalah peningkatan influk Ca dari ekstrasel ke dalam sel melalui pembentukan pori-pori pada plasma membran (Cevik *et al.* 2009).

Aktivasi oosit menggunakan sediaan pemicu peningkatan kalsium intrasel harus disertai dengan pemberian Cytochalasin B. Sediaan ini berperan dalam mencegah terjadinya ekstrusi badan polar 2 (Han dan Gao 2013; Kharche dan Birade 2013). Kegagalan pengeluaran badan polar 2 menyebabkan sel telur masih bertahan dalam fase diploid. Pembentukan pronukleus setelah terjadi kegagalan ekstrusi badan polar 2 diinduksi oleh adanya penurunan MAPK akibat peningkatan kalsium oleh medium aktivasi partenogenetik yang digunakan (Mitalipov *et al.* 2001). Berdasarkan laporan Mitalipov *et al.* (2001) tersebut menunjukkan cytochalasin B tidak terbukti menginduksi pembentukan pronukleus, tetapi pembentukan pronukleus terjadi seperti mekanisme pembentukan pronukleus pada fertilisasi natural.

Cycloheximid merupakan sediaan penghambat sintesis protein yang dapat menyebabkan aktivasi oosit babi (Ye *et al.* 2005), tetapi menyebabkan dekstruksi pada oosit sapi (Lonergan *et al.* 1998). Cycloheximid menyebabkan defilamentasi aktin oosit, sehingga terjadi *meiosis blocking* pada oosit terhenti (German *et al.* 2015). Aktin merupakan salah satu material pendukung terjadinya meiotic arrest pada oosit. Laporan sebelumnya menyatakan bahwa maturasi oosit pada zebrafish ditandai dengan adanya pelepasan CCNB1 yang tersimpan dalam granula terikat filamen aktin (Kotani *et al.* 2013). Senyawa antioksidan dan 6-DMAP bekerja melalui mekanisme penghambatan molekul MPF dalam ooplasma. Pemberian senyawa antioksidan seperti vitamin E dan vitamin C pada oosit babi menunjukkan peningkatan insidensi auto-partenogenetik yang disebabkan oleh penurunan MPF (Marques *et al.* 2011). Sediaan 6-DMAP bekerja dengan menghambat aktivasi reseptor protein kinasi yang kemudian menyebabkan ketidakstabilan benang-benang kromosom dan penurunan *mitogen activated protein kinase* (Liu *et al.* 1998).

Hasil pengujian menggunakan kombinasi sediaan peningkat kalsium intraselular dengan cytochalasin B menunjukkan hasil yang hampir sama. Penggunaan etanol pada oosit sapi menunjukkan sifat aktivasi yang lebih baik daripada strontium, tetapi strontium menunjukkan jumlah embrio yang mampu bertahan hingga oosit lebih baik (Meo *et al.* 2004). Pada oosit tikus, penggunaan etanol dengan cytochalasin B dianggap memberikan hasil terbaik. Etanol mampu mengaktivasi oosit tikus secara lebih efektif, tetapi menunjukkan perkembangan blastosit yang tidak berbeda jauh dengan hasil aktivasi oleh strontium (Han dan Gao 2013). Hasil penelitian lain menunjukkan penggunaan stimulasi elektrik dalam mengaktivasi oosit menunjukkan hasil yang lebih baik daripada penggunaan bahan kimia. Aktivasi menggunakan listrik 2×1.6 kV selama 30 μ s dengan interval 100 ms pada oosit tikus menghasilkan blastosit terbentuk yang lebih banyak daripada aktivasi dengan kombinasi ionomycin-cycloheximide (10 μ mol/ L selama 5 menit dan 10 μ g/ L selama 4 jam) ataupun SrCl₂ (10 mmol/ L selama 4 jam) (Versieren *et al.* 2010).

Metode Kultur Embrio Partenogenetik dan Evaluasi Sifat *Stemness*-nya

Teknik dan metode kultur menjadi salah satu elemen penting yang diperlukan dalam upaya produksi embrio partenogenetik dan pemanfaatannya menjadi sumber stem sel untuk terapi kerusakan jantung, terutama katup jantung. Selain embrio partenogenetik, terdapat beberapa sumber stem sel terutama untuk terapi kerusakan jantung, yaitu *bone marrow stromal cells*, *skeletal myoblast*, *fetal/ neonatal cardiomyocytes*, *endothelial progenitor cells*, *smooth muscle cells*, dan *embryonic stem cells* (El Fahime dan Tremblay 2006). Dari semua sumber stem sel yang dapat digunakan, *embryonic stem cells* merupakan sumber stem sel yang diduga mempunyai sifat yang paling baik dibanding stem sel lain (Segers dan Lee 2008). Meskipun demikian, jenis stem sel ini banyak menjadi perdebatan karena adanya pendapat bahwa embrio adalah sumber individu baru, sehingga manipulasinya merupakan salah satu tindakan pelanggaran kode etik (Fischbach dan Fischbach 2004).

Salah satu sumber stem sel embrionik dan mempunyai potensi yang baik untuk dikembangkan menjadi biomaterial terapi penyakit kelainan jantung adalah *parthenogenetik embryonic stem cell* (pESCs). Seperti namanya, stem sel asal material ini berasal dari embrio yang dikembangkan dari satu gamet (maternal saja) (O'sea 1999). Keberadaan pESCs diduga menjadi alternatif sumber stem sel yang baik. Stem sel asal pESCs mempunyai sifat diferensiasi dan potensi terapeutik yang hampir sama dengan ESCs (Jurkowski *et al.* 2002; Brevini dan Gandolfi 2008). Embrio pESCs tidak dibatasi oleh etika. Secara normal, pESCs tidak mampu bertahan hingga lahir di dalam saluran reproduksi induk karena embrio partenogenetik mempunyai kelainan gen pengode proses implantasi (Newman-Smith dan Werb 1995). Berdasarkan karakteristik tersebut, embrio partenogenetik bukan merupakan calon individu baru seperti halnya ESC yang berasal dari embrio terfertilisasi dan bebas dari persoalan etika (Latkovic 2002).

Sumber embrio partenogenetik pada hewan tingkat tinggi telah berhasil dilakukan dengan menggunakan oosit hasil *rescue* atau panen dari superovulasi.

Embrio partenogenetik dilaporkan dapat dilakukan menggunakan oosit mencit, tikus, kerbau, sapi, kuda, dan primata (Kharce dan Birade 2013). Keberhasilan aktivasi oosit menjadi embrio partenogenetik dipengaruhi oleh umur induk yang digunakan sebagai donor. Keberhasilan pembentukan embrio partenogenetik menurun dengan seiring dengan penambahan umur donor yang digunakan (Bai *et al.* 2006). Diduga penurunan amplitudo osilasi kenaikan kalsium intrasel yang tidak optimal karena adanya radikal bebas menjadi penyebab penurunan kualitas embrio partenogenetik yang dihasilkan dari oosit berusia tua (Nasr-Esfahani *et al.* 2010).

Penggunaan mencit sebagai donor oosit dalam penelitian partenogenetik dilakukan dengan metode superovulasi. Mencit yang digunakan adalah mencit yang telah berada di masa subur yaitu 6-8 minggu (Luo *et al.* 2011). Induksi superovulasi dapat dilakukan dengan pemberian sediaan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), *human menopausan gonadotropin* (HMG), atau *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) yang kemudian dilanjutkan dengan induksi ovulasi menggunakan *human chorionic gonadotropin* (HCG). Dosis superovulasi yang dinyatakan memberikan hasil paling optimal terhadap jumlah oosit yang digunakan dari tiga induktor superovulasi tersebut adalah 10 IU PMSG secara intraperitoneal dan 10 IU HCG secara intra peritoneal 46-48 jam setelah induksi dengan PMSG (Heidari *et al.* 2013). Berdasarkan beberapa laporan, induksi superovulasi untuk menghasilkan oosit sumber embrio partenogenetik menggunakan PMSG dengan rentang dosis 5-10 IU per ekor dan dilanjutkan dengan HCG dengan dosis yang sama setelah 46-48 jam pascainjeksi PMSG (Luo *et al.* 2011; Didie *et al.* 2013).

Koleksi oosit pada mencit yang disuperovulasi dilakukan dengan bedah laparotomi. Waktu koleksi yang disarankan adalah 15-20 jam setelah penyuntikan HCG (Lou *et al.* 2011). Pada waktu tersebut, oosit berada di ampula tuba falopii. Hasil koleksi oosit disimpan dalam larutan *phosphat bufer saline free calcium and magnesium* (FBS minus). Sediaan ini berfungsi sebagai media pemelihara proses fisiologi dan integritas dalam media kultur dalam batas waktu tertentu (Haemek 2012). Sel telur yang telah diperoleh kemudian dilakukan pelepasan dari sel-sel kumulus dengan melakukan pencucian kompleks oosit-kumulus ooforus pada hyaluronidase 1 mg/mL selama 10 menit. Aktivasi oosit menggunakan strontium klorida 10 mmol/L di dalam larutan medium CZB tanpa kalsium yang ditambahkan dengan 5 mg/ml *bovine serum albumin* dan 100 U/ mL penisilin dan 100 g/ mL streptomisin selama 6 jam (Didie *et al.* 2013). Pencegahan pengeluaran polar bodi ke-2 dilakukan dengan pemberian cytochalasin B (5 µg/ mL).

Telur terfertilisasi diinkubasikan selama 6 hari. Blastosis yang diperoleh dipindahkan dalam *knock out* DMEM medium yang diberikan 20% *serum replacement*. Sel yang telah ditrsinasi dipindahkan dalam media *Dulcecco's modified Eagle's medium* (DMEM) tinggi glukosa, tanpa piruvat, dan dengan 25 mmol/L HEPES yang ditambahkan dengan 20% *fetal calf serum*. Sel diperoleh dipisahkan setiap 48-72 jam dengan 0.25% tripsin EDTA.

Karakterisasi sifat pluripoten partenogenetik stem sel dilakukan terhadap parameter morfologi, alkalin fosfatase, sifat sebagai stem sel, dan kecepatan pertumbuhan pluripoten stem sel. Alkalin fosfatase merupakan enzim yang muncul di hampir semua organisme. Alkalin fosfatase diduga merupakan salah satu marker yang

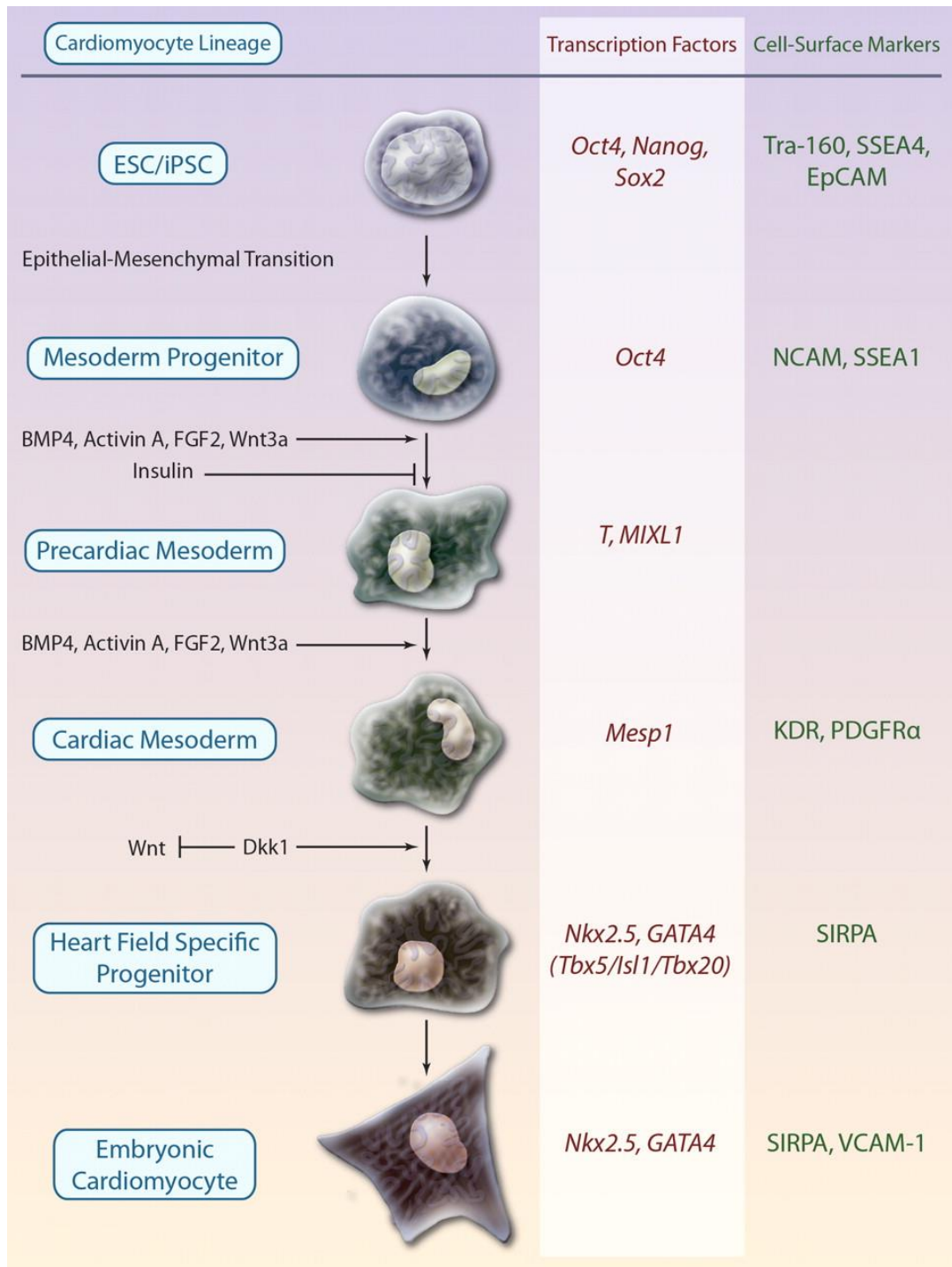
dapat digunakan dalam menetapkan sifat pluripoten sel dalam pengujian stem sel (Stefkova *et al.* 2015). Dari 4 jenis alkalin fosfatase, TNAP disinyalir sebagai marker alkalin fosfatase yang paling signifikan dalam pengujian sifat pluripoten sel. TNAP ditemukan tinggi rendah sebelum terjadi implantasi pada embrio, meningkat tajam 7 hari post coitus, dan mendatar hingga 4 minggu fase gestational manusia (Stoop *et al.* 2005).

Pengujian sifat puripotensi sel juga dapat dilakukan dengan pelabelan terhadap marker gen POU5F1, NANOG, FUT4. Menurut Lee *et al.* (2013), gen POU5F1, NANOG, FUT4 merupakan gen penanda berubahnya sifat maternal faktor menjadi zigot faktor. Pengujian terhadap marker gen-gen ini penting dalam penelitian partenogenetik yang menunjukkan bukti perubahan sifat oosit dari maternal menjadi zigot.

Principal component analysis merupakan uji pemetaan genom berdasarkan database pada material stem sel untuk memperoleh kedekatan sifat pluripoten genom yang dimunculkan (Palmer *et al.* 2012). Hasil pengujian sifat pluripotensi pada embrio partenogenetik menunjukkan tidak terdapat perubahan morfologi sel, positif terhadap marker TNAP, POU5F1, NANOG, dan FUT4, serta kecepatan pertumbuhan embrio partenogenetik hampir sama dengan embrio partenogenetik (Didie *et al.* 2013).

Diferensiasi pluripoten sel menjadi kardiomyosit spesifik menggunakan regulasi marker gen spesifik. Gambaran faktor transkripsi dan marker permukaan sel dari sel pluripoten menjadi sel kardiomyosit disajikan pada Gambar 2. Upaya diferensiasi menjadi sel kardiomyosit dapat dilakukan menggunakan tiga cara, yaitu diferensiasi menggunakan *co-culture* dari sel stoma menyerupai endokardium, pembentukan *embryoid body*, atau dengan diferensiasi monolayer PSC (Batalov dan Feinberg 2015). Penggunaan END-2 cells dan P19 EC sebagai *co-culture* mampu menumbuhkan sel setelah 2-3 minggu dan memunculkan sel yang dapat berdenyut setelah 5 hari berikutnya (Mummery *et al.* 2002). *Co culture* memungkinkan adanya sekresi mikropartikel yang berperan dalam pengaturan dan regulasi diferensiasi sel dari pluripoten menjadi sel kardiomyosit. Hasil pengujian oleh Graichen *et al.* (2008), induksi diferensiasi menjadi kardiomyosit menghasilkan 20% area dalam media kultur menunjukkan kemampuan berdenyut.

Pembentukan *embryoid body* dilakukan dengan *hanging drop method*. Melalui metode ini dilakukan pemisahan setiap 50 sel di dalam 20 μ L medium Iscove yang ditambahkan dengan 20% *fetal calf serum* (Didie *et al.* 2013). EB terbentuk dalam waktu 2 hari. EB terbentuk kemudian ditransfer ke cawan petri untuk dilakukan kultur dalam suspensi selama 5 hari sebelum kemudian dipindahkan dalam cawan kultur. EB yang menunjukkan kontraksi dipilih untuk dilakukan karakterisasi. Teknik diferensiasi menggunakan *embryoid body* menggunakan kombinasi fisik dan kimia untuk memodulasi diferensiasi pluripoten sel menjadi kardiomyosit (Batalov dan Feinberg 2015). Hasil diferensiasi menggunakan teknik ini, sebanyak 5-70% *embryoid body* muncul denyut (Kawamura *et al.* 2012).



Gambar 2 Marker diferensiasi pluripoten sel menjadi sel kardiomyosit (Mummery *et al.* 2012)

Beberapa penelitian terdahulu telah mencoba melakukan induksi diferensiasi kardiomyosit dari *partenogenetic stem cell* menggunakan medium spesifik. Beberapa

contoh keberhasilan induksi diferensiasi PSC menjadi kardiomiosit disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Induksi diferensiasi PSC menjadi kardiomiosit

DIFFERENTIATION METHOD	PSC EXPANSION MEDIUM	SUBSTRATE MATRIX	DIFFERENTIATION MEDIUM	ADDITIONAL COMPONENTS	HUMAN ESC LINES TESTED	HUMAN iPSC LINES TESTED	CHEMICALLY DEFINED	XENO-FREE	ALL COMPONENTS OPTIMIZED
Laflamme et al (2007) ³²	MEF-conditioned medium	Matrigel	RPMI 1640 + B27	Activin A, BMP4	1	0	-	-	-
Lian et al (2012) #1 ³⁵	mTeSR1	Matrigel	RPMI 1640 + B27 (w/o insulin for the first 7 days)	CHIR99021 (GSK-inhibitor), Activin A, BMP4	3	3	+	-	-
Lian et al (2012) #2 ³⁵	mTeSR1	Matrigel	RPMI 1640 + B27 (w/o insulin for the first 7 days)	CHIR99021 (GSK-inhibitor), IWP-2 or IWP-4 (Wnt-inhibitors)	3	3	+	-	-
Cao et al (2013) ³⁷	mTeSR1	Matrigel	CVPC induction medium (CIM), Cardiomyocyte differentiation medium 1 and 2 (CDM1 and CDM2)	Ascorbic acid, BMP4, CHIR99021 (GSK-inhibitor), dorsomorphin (BMP-inhibitor), A83-01 (activin/nodal inhibitor), IWR1 (Wnt/ β -catenin signaling inhibitor)	2	1	+	-	-
Burridge et al (2014) ³³	E8	Matrigel, laminin, or vitronectin	CDM3: RPMI 1640 + albumin + L-ascorbic acid 2-phosphate	CHIR99021 (GSK3-inhibitor), Wnt-C59 (Wnt-inhibitor)	2	11	+	+	+

Evaluasi hasil diferensiasi dilakukan dengan analisis struktur dan fungsi sel, ekspresi marker sel jantung, dan elektrofisiologi (Pekanan-Mattila 2010). Keberhasilan diferensiasi menjadi sel jantung salah satunya adalah kesamaan struktur dan fungsi sel kardial terbentuk dengan fenotif sel jantung dewasa. Penilaian struktur sel kardial hasil diferensiasi dilakukan dengan mengukur ukuran sel, keseragaman sel, dan densitas myofibril (Lundy *et al.* 2013). Sel kultur yang terdiferensiasi sempurna menjadi sel jantung ditandai dengan kemampuan dibedakan struktur zona sarkomernya, mitokondria, dan gap junction (Kehat *et al.* 2001). Fungsi sel jantung dilakukan dengan mendeteksi kemampuan kontraktilitas melalui pemasangan video mikroskopi untuk merekam pergerakan (denyut) sel (Lundy *et al.* 2013).

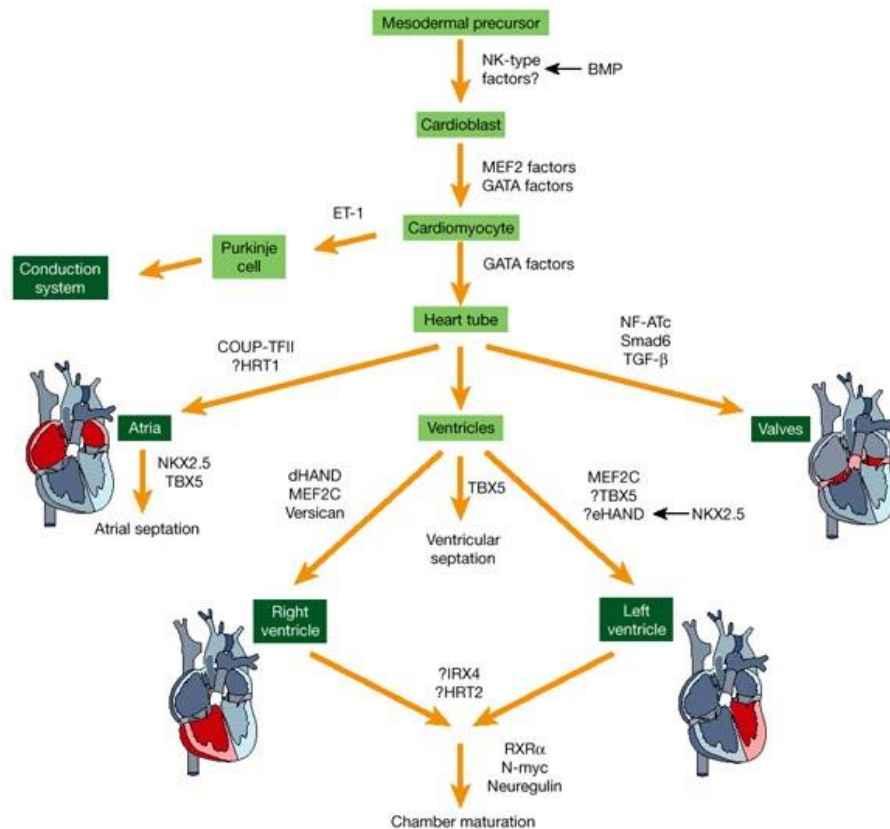
Terdapat beberapa marker yang digunakan sebagai acuan terjadi proses diferensiasi dari pluripoten sel menjadi sel jantung. Marker yang sering digunakan adalah Pou5f1, Nanog (marker pluripoten), T, Kdr, Isl1 (marker mesoderm), Nkx2-5, dan Myh6 (marker spesifik terhadap kardiomiosit) (Didie *et al.* 2013). Diferensiasi dari kardiomiosit menjadi sel katup memerlukan marker yang lebih spesifik. Menurut Shelton dan Yutzey (2008), Twist1 banyak ditemukan pada proses pembentukan katup.

Elektrofisiologi adalah penggambaran kelistrikan jantung. Diferensiasi ini merupakan salah satu cara untuk melakukan pengelompokan sel hasil diferensiasi. Didalam jantung terdapat *ventricle like cells*, *purkinje like cells*, *atrial like cells*, dan *pacemaker like cells* yang mempunyai grafik kelistrikan jantung yang berbeda (Pekanan-Mattila 2010).

Proses Pembentukan Katup Jantung pada Masa Embrional

Belum ditemukan laporan diferensiasi dari sel pluripoten menjadi sel spesifik katup jantung. Terdapat dua jenis sel katup, yaitu sel endotel valvular (SEV) dan sel intersitial valvular (SIV). SEV adalah sel yang sama dengan sel paling luar dari endokardium dan endotel buluh darah (Tao *et al.* 2012). Pada kondisi infeksi penyakit atau luka, VECs katup berperan dalam menginduksi proses proliferasi sel intersitial katup dengan dibantu oleh matriks ekstra seluler (Bischoff dan Aikawa 2011). Sel intersitial katup terdiri dari sel-sel yang lebih heterogen dibanding VECs. Beberapa jenis sel intersitial katup adalah sel otot polos, fibroblas, dan myofibroblas (Tao *et al.* 2012). Sel-sel yang terdapat dalam intersitial katup berperan dalam mensekresikan matriks ekstra seluler (Fondard *et al.* 2005). Sel-sel intersitial katup juga dicirikan mempunyai responsivitas yang sangat baik terhadap rangsangan kimia atau fisika (Sack dan Yoganathan 2007).

Pemahaman proses pembentukan katup diharapkan mampu memberikan gagasan teknik pembentukan sel spesifik katup jantung. Katup jantung dibentuk di daerah kanal atrio-ventrikular dan area *outer flow tract* (OFT). Regulasi diferensiasi sel dilakukan oleh berbagai macam protein signaling. Gambaran signaling dari mesoderm hingga menjadi sel jantung spesifik disajikan pada Gambar 3.

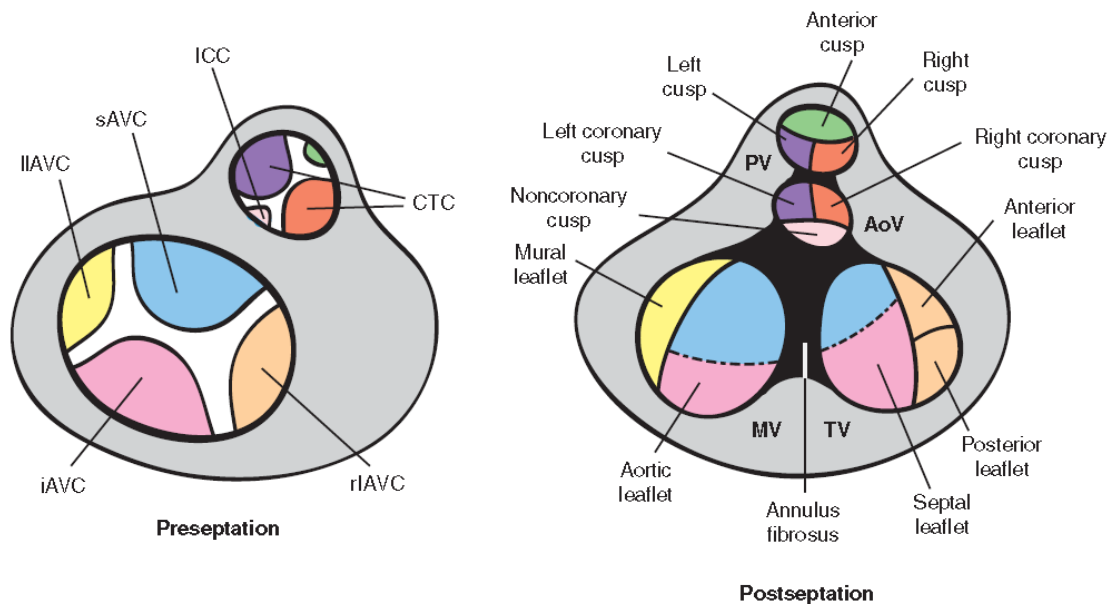


Gambar 3 Regulasi diferensiasi dari mesodermal menjadi sel kardial spesifik (Srivastava dan Olson 2000)

Signaling pembentukan katup jantung dimulai dari protein Bmp2 yang kemudian mengaktivasi Tbx20, Hey1, Hey2, Tbx2 (Yamada *et al.* 2000). Penentuan batasan area katup dilakukan oleh Tbx20, Hey1, dan Hey2 setelah terjadi penurunan Bmp2 dan Tbx2 (MacGrogan *et al.* 2015). Pembentukan jaringan mesenkim katub diinduksi oleh protein Notch1 yang menyebabkan penghambatan pensinyalan Bmp2 (Luna-Zurita *et al.* 2010).

Proses pembentukan pertama katup jantung tikus terjadi pada hari ke-9.5 (MacGrogan *et al.* 2015). Proses diawali dengan penebalan pada daerah atrio-ventrikular dan OFT. Penebalan tersebut merupakan penumpukan komponen matriks ekstraselular katup jantung. Proses penebalan distimulir oleh protein Snail1 dan Slug/Snail2 (Person *et al.* 2005) atau Bmp, *transforming growth factor* β , dan Notch (Yamagishi *et al.* 2009). Proses ini didukung dengan proliferasi sel intersitial katup yang diinduksi oleh gen Nfac1 (Lin *et al.* 2012) dan ErbB/SHP-2/NF-1/Ras (Iwamoto dan Mekada 2006).

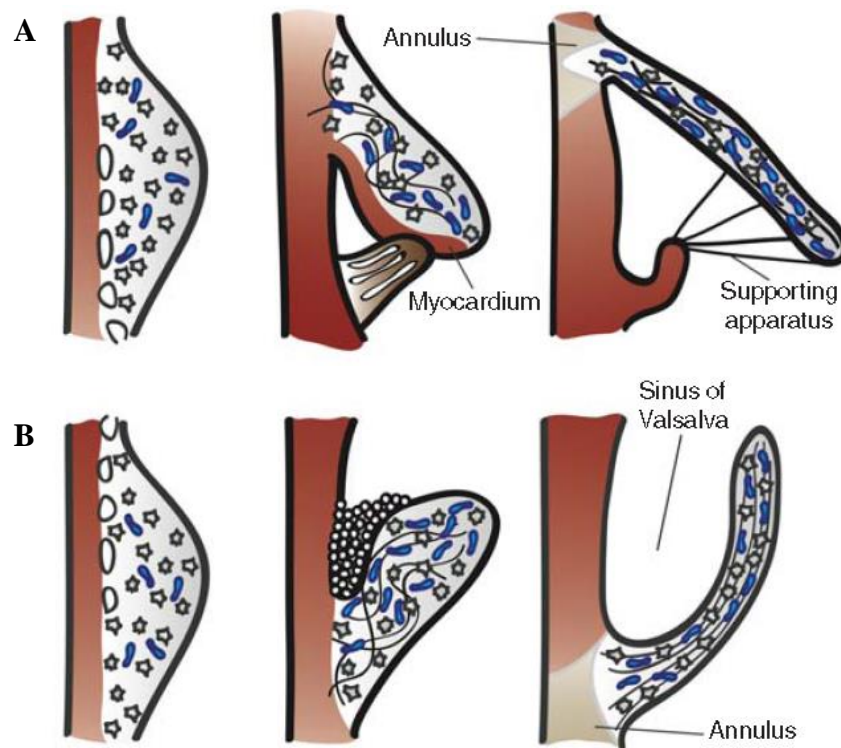
Pembentukan katup tidak terlepas dari pembentukan sekat ruang jantung. Pada hari ke 10.5, terjadi gumpalan mesekhimi yang memenuhi rongga kanal atrio-ventrikular (AVC). Gumpalan ini yang akan berkembang menjadi katup bikuspidalis dan trikuspidalis. Terdapat empat daun katup yang terbentuk pada saat pembentukan katup, yaitu *superior* (sAVC), *left lateral* (lIiAVC), *right lateral* (rIiAVC), dan *inferior* (iAVC) (Gambar 4). Pembentukan katup dilakukan dengan membagi dua gumpalan mesenkimi AVC menjadi katup trikuspidalis dan bikuspidalis. Penyatuan sAVC dan iAVC menjadi bakal pembentukan utama kedua katup ini. Pada katup trikuspidalis, terjadi pembelahan daun rIiAVC menjadi dua, sehingga diperoleh tiga daun katup.



Gambar 4 Proses pembentukan katup jantung embrio tikus (Sumber : MacGrogan *et al.* 2015)

Proses yang sama terjadi pada pembentukan katup semilunar di area OFT. Pembentukan tiga daun katup dilakukan dengan pembagian rIOTC dan lIOTC menjadi masing-masing dua. Katup aorta memunyai daun katup yang berasal dari rIOTC, lIOTC, dan iOTC, sedangkan katup pulmonar memunyai daun katup yang berasal dari rIOTC, lIOTC, dan sOTC (Gambar 4). Sekat antara katup ditutup dengan annulus fibrosus, sehingga terjadi pemisahan dua ruangan secara sempurna. Pemisahan aorta dan dan arteri pulmonalis dilakukan dengan bantuan krista syaraf (Midgett dan Rugonyi 2014).

Proses perapihan jaringan penunjang katup dilakukan mulai hari ke 13.5 fase embrional tikus. Korda tendinae, anulus fibrosus, dan musculus papilaris merupakan derivat dari endokardium. Pembentukan jaringan tersebut dilakukan dengan pemisahan lapisan dari dalam zona dinding ventrikel (Gambar 5 A). Pada katup semilunar, terjadi pembuatan lubang di sepanjang bakal daun katup membentuk sinus valsava dan pengubahan sel progenitor jantung di bagian dasar daun katup menjadi sel matang penunjang (Gambar 5 B).



Gambar 5 Proses finalisasi pembentukan katup jantung tikus

Keterangan : A: katup di AVC, B: katup di OFT

(Sumber : MacGrogan *et al.* 2015)

Stem Sel sebagai Sumber Terapi Kelainan Katup Jantung

Penggunaan stem sel diduga mempunyai banyak kelebihan. Stem sel autolog diduga mempunyai kelebihan berupa respons penolakan yang minimal. Manfaat lain dengan pembiakan secara *in vivo* adalah hilangnya batasan molekul signaling parakrin dibanding metode kultur. Meski demikian terdapat tantangan ke depan yang perlu dijawab sebelum penggunaan stem sel sebagai terapi kelainan jantung. Seperti laporan Flanagan *et al.* (2009), pemberian stem sel dalam terapi katup jantung domba menyebabkan penebalan dan kontraksi katup, sehingga terjadi regurgitasi cairan jantung.

Penggunaan pESCs dalam terapi kerusakan katup jantung merupakan salah satu solusi yang diduga menyajikan jalan terang bagi optimalisasi terapi penyakit jantung. Beberapa tantangan ke depan yang perlu dipecahkan dalam aplikasi pESCs menjadi sediaan terapeutik penyakit kerusakan jantung adalah teknik isolasi dan permurnian, cara aplikasi, evaluasi tingkat kelangsungan hidup dan proliferasi stem sel, integrasi sel asal stem sel dengan kelistrikan jantung, dan tingkat stabilitas serta keamanan penggunaan pESCs (Segers dan Lee 2008).

KESIMPULAN

Embrio partenogenetik merupakan salah satu material yang potensial sebagai sumber stem sel. Meski demikian diperlukan penelitian yang panjang dan terstruktur mengenai stem sel ini agar dapat dimanfaatkan sebagai sediaan terapeutik yang aman, efektif, dan efisien.

Daftar Pustaka

- Abou-haila A, Tulsiani DR. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys.* 485(1):72-81.doi: 10.1016/j.abb.2009.02.003.
- Adjuk A, Ciemerych MA, Nixon V, Swann K, Maleszewski M. Fertilization differently affects the levels of cyclin B1 and M-phase promoting factor activity in maturing and metaphase II mouse oocytes. *Reproduction.* 136(6):741-752.
- Bai ZD, Liu K, Wang XY. 2006. Developmental potential of aged oocyte rescued by nuclear transfer following parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev.* 73(11):1448-1453.
- Barefoot J, Bruce D, Laurie G, Bauer N, Paterson J, Bownes M. 2009. *Stem Cells Science and ethics.* Edinburgh (UK): The University of Edinburgh.

- Bass PF. 2015. Anatomy and function of the heart valves [Internet]. [Diunduh 2021 Desember 30]. Tersedia pada: <https://www.urmc.rochester.edu/encyclopedia/content.aspx?ContentTypeID=90&ContentID=P03059>.
- Batalov I, Feinberg AW. 2015. Differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells using monolayer culture. *Stem Cell Biol.* 10(S1):71-76.
- Bischoff J, Aikawa E. 2011. Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium. *J Cardiovasc Transl Res.* 4:710–719.
- Boni R, Gualteri R, Talevi R, Tosti E. 2007. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. *Theriogenology.* 68(1):S156-S164.
- Brevini TA, Gandolfi F. 2008. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. *Cell Prolif.* 41(1):20-30.
- Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, *et al.* 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods.* 11(8):855-860.
- Cao N, Liang H, Huang J, Wang J, Chen Y, Chen Z, Yang HT. Highly efficient induction and long-term maintenance of multipotent cardiovascular progenitors from human pluripotent stem cells under defined conditions. *Cell Res.* 2013;23(9):1119–32.
- Cevik M, Tas A, Akkoc T, Bagis H, Arat S. 2009. A comparative study of parthenogenetic activation and in vitro fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Turk J Vet Anim Sci.* 33(5):393-399.
- Comb MD, Yutzey KE. 2009. Heart valve development: regulatory networks in development and disease. *Cir Res.* 105:408-421.
- Didie M, Christalla P, Rubart M, Muppala V, Doker S, Unsold B, El-Armouce A, Rau T, Eschenhagen T, Schwoerer AP, *et al.* 2013. Parthenogenetic stem cells for tissue engineered heart repair. *J Clin Invest.* 123(3):1297.
- El Fahime E, Tremblay J. 2006. Myocardial regeneration: which cell and why. Di dalam: Dib N, Taylor DA, Diethrich EB, editor. *Stem Cell Therapy and Tissue Engineering for Cardiovascular Repair from Basic Research to Clinical Applications.* New York (US): Springer Science and Business Media.
- Fischbach GD, Fischbach RL. 2004. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest.* 114(10):1364-1370.
- Flanagan TC, Sachweh JS, Frese J, Schnoring H, Gronloh N, Koch S, Tolba RH, Schmitz-Rode T, Jockenhoewel S. 2009. In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model. *Tissue Eng Part A.* 15: 2965–2976.
- Fondard O, Detaint D, Iung B, Choqueux C, Adle-Biassette H, Jarraya M, Hvass U, Couetil JP, Henin D, Michel JB, *et al.* 2005. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: The role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J.* 26: 1333–1341.
- Fulka J Jr, Lebfried-Rutledge ML, First NL. 1991. Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* 29(4):379-384.

- German SD, Lee JH, Campbell KH, Sweetman D, Alberio R. 2015. Actin depolymerization is associated with meiotic acceleration in cycloheximide-treated ovine oocytes. *Biol Reprod.* 92(4):103.
- Graichen R, Xu X, Braam SR, Balakrishnan T, Nofiza S, Sieh S, Soo SY, Tham SC, Mummery C, Colman A, *et al.* 2008. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation.* 76(4):357-370.
- Griswold MD. 2016. Spermatogenesis: the commitment meiosis. *Physiol Rev.* 96(1):1-17.doi:10.1152/physrev.00013.2015.
- Haemek KB. 2012. Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) [Internet]. [Diunduh pada 2016 Januari 15]. Tersedia pada: http://www.bioind.com/page_14416.
- Han BS, Gao JL. 2013. Effect of chemical combination on the parthenogenetic activation of mouse oocytes. *Exp Ther Med.* 5(5):1281-1288.
- Heidari MH, Daliry M, Kalamati J, Behmanesh A, Tadayon M, Bahrami Z. 2013. Effect of race and hormonal factors on egg production in mice. *Bull Env Live Sci.* 2(10):113-117.
- Iwamoto R, Mekada E. 2006. ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Struct Funct.* 31: 1–14.
- Jones KT. 2003. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 10(1):1-5.
- Jones KT. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spikig to cell cycle progression. *Reproduction.* 130:813-823.doi:10.1530/rep1.00710.
- Jones KT. 2007. Intracellular calcium in the fertilization and development. *Proceedings of the Australian Physiological Society.* 38:35-41.
- Jurkowski A, Guerrero G, Sharples F, Fagen A. 2002. *Understanding Stem Cells - an Overview of the Science and the Issues from the National Academies.* Washington (US): The National Academy of Sciences.
- Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi Y, Kawamura T, Kurutani T, Daimon T, Shimizu T, *et al.* 2012. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation.* 126(11 Supl 1):S29-S37.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 2001. 108(3):407-14.
- Kharche SD, Birade HS. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: a review. *Adv Biosci Biotech.* 4:170-182.
- Kotani T, Yasuda K, Ota R, Yamashita M. 2013. Cyclin B1 mRNA translation is temporary controlled through formation and disassembly by RNA granules. *J Cell Biol.* 202:1041-1055.
- Lafamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, *et al.* 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotech.* 25:1015-1024.

- Latkovic MS. 2002. The science and ethics of parthenogenesis. *Nat Cathol Bioethic Quart.* 2(2):245-255.
- Lee MT, Bonneau AR, Takacs CM, Bazzini AA, Divito KR, Fleming ES, Giraldez AJ. 2013. Nanog, Pou5f1 and SoxB1 activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition. *Nature.* 503(7476):360-364.
- Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zgang J, Kamp TJ, Palecak SP. 2012. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(27):E1848-1857.
- Lin CJ, Lin CY, Chen CH, Zhou B, Chang CP. 2012. Partitioning the heart: Mechanisms of cardiac septation and valve development. *Development* 139: 3277–3299.
- Liu L, Ju JC, Yang XZ. 1998. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocyte. *Biol Reprod.* 59:537-545.
- Liu L, Yang X. 1999. Interplay of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase inactivation during metaphase-to-interphase transition of activated bovine oocytes. *Biol Reprod.* 61(1):1-7.
- Lonergan P, Fair T, Khatir H, Cesaroni G, Mermillod P. 1998. Effect of protein synthesis inhibition before or during in vitro maturation on subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology.* 50:417-531.
- Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. 2013. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 22(14):1991-2002.
- Lung B, Vahanian A. 2014. Epidemiology of acquired valvular heart disease. *Can J Cardiol.* 30(9):962-970.
- Luna-Zurita L, Prados B, Grego-Bessa J, Luxan G, delMonte G, Benguria A, Adams RH, Perez-Pomares JM, de la Pompa JL. 2010. Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and Bmp2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation. *J Clin Invest.* 120: 3493–3507.
- Luo C, Zuniga J, Edison E, Palla S, Dong W, Parer-Thornburg J. 2011. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *K Am Assoc Lab Anim Sci.* 50(4):471-478.
- MacGrogan D, Luxan G, Driessen-Mol A, Bouten C, Baaijens F, de la Pompa J. 2015. How to make a heart valve: from embryonic development to bioengineering of living valve substitutes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:a013912.
- MacLennan M, Crichton JH, Playfoot CJ, Adams IR. 2015. Oocyte development, meiosis, and aneuploidy. *Seminars Cell Develop Biol.* 45:68-76.
- Madgwick S, Nixon VL, Chang HY, Herbert M, Levasseur M, Jones KT. 2004. Maintenance of sister chromatic attachment in mouse eggs through maturation promoting factor activity. *Development Biol.* 275:68-81.
- Marques MG, Nascimento AB, Gerger RP, Gonzales JS, Coutinho AR, Simoes R, Assumpcao ME, Visintin JA. 2011. Effect of culture media on porcine embryos produced by in vitro fertilization or parthenogenetic activation after oocyte maturation with cycloheximide. *Zigote.* 19(4):331-337.

- Mehta RH. 2014. Sourcing human embryos for embryonic stem cell lines: problems & perspectives. *Indian J Med Res.* 140:S106-111.
- Meo SC, Leal CLV, Garcia JM. 2004. Activation and early parthenogenesis of bovine oocytes treated ethanol and strontium. *Anim Reprod Sci.* 81(1-2):35-46.
- Miao YL, Stein P, Jefferson WN, Pradilla-Banks E, Williams CJ. 2012. Calcium influx-mediated signaling is required for complete mouse egg activation. *PNAS.* 109(11):4169-4174. doi:10.1073/pnas.1112333109.
- Midgett M, Rugonyi S. 2014. Congenital heart malformations induced by hemodynamic altering surgical interventions. *Front Physiol.* 5:287.
- Mitalipov SM, Nusser KD, Wolf DP. 2001. Parthenogenetic activation of Rhesus Monkey oocytes and reconstructed embryo. *Biol Reprod.* 65:253-259.
- Mummery C, Ward D, van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Optof, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, van der Heyden M, Pera M. 2002. Cardiomyocyte of differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat.* 200(3):233-242.
- Mummery CI, Zhang J, Ng ES, Elliot DA, Elefanty AG, Kamp TJ. 2012. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes – a methods overview. *Circ Res.* 111:344-348.
- Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalee M. 2010. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 94(2):520-526.
- Newman-Smith ED, Werb Z. 1995. Stem cell defects in parthenogenetic peri-implantation embryos. *Development.* 121:2069-2077.
- O'Day DH. 2010. Fertilization: intercellular communication & signal transduction [Internet]. [Diunduh 2022 Jan 6]. Tersedia pada: <http://www.utm.utoronto.ca/~w3bio380/pdf/OLDPDF/2010%20Summer/Fertilization%20Signal%20Transduction.pdf>.
- O'Sea KS. 1999. Embryonic stem cell models of development. *Anat Rec.* 257(1):32-41.
- Palmer NP, Schmid PR, Berger B, Kohane IS. 2012. A gene expression profile of stem cell pluripotentiality and differentiation is conserved across diverse solid and hematopoietic cancers. *Gen Biol.* 13:R71. doi:10.1186/gb-2012-13-8-r71.
- Pekonen-Mattila M. 2010. Cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells [Disertasi]. Tampere (FI): University of Tampere.
- Person AD, Klewer SE, Runyan RB. 2005. Cell biology of cardiaccushion development. *Int Rev Cytol.* 243:287–335.
- Rahman MS, Kwon WS, Pang MG. 2014. Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update. *Biomed Res Int.* 2014:8416151. doi:10.115/2014/841615.
- Sacks MS, Yoganathan AP. 2007. Heart valve function: A biomechanical perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 362: 1369–1391.
- Schoen FJ, Levy RJ. 2005. Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 79: 1072–1080.
- Segers VFM, Lee RT. 2008. Stem cell therapy for cardiac disease. *Nature.* 451: 937-942.

- Shelton EL, Yutzey KE. 2008. Twist1 function in endocardial cushion cell proliferation, migration, and differentiation during heart valve development. *Development Biol.* 317(1):282-295.
- Sivaraman MA, Noor SN. 2015. Human embryonic stem cell research: ethical views of Buddhist, Hindu and Catholic leaders in Malaysia. *Sci Eng Ethics.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26049934>.
- Srivastava D, Olson EN. 2000. Progress a genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* 407:221-226.
- Stefkova K, Prochazkova J, Pachernik J. 2015. Alkaline phosphatase in stem sel. *Stem Cell Int.* 2015:628368.doi:10.1155/2015/628368.
- Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer, Looijenga HJ. 2005. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Rep.* 20 (6): 1466-1476.
- Sun QY, Nagai T. 2003. Molecular mechanism underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev.* 49(5):347-359.
- Tachibana K, Hara M, Hattori Y, Kishimoto T. 2008. Cyclin B-cdk 1 control pronuclear union in interphase. *Current Biol.* 18(17):1308-1313.
- Tao G, Kotick JD, Lincoln J. 2012. Heart valve development, maintenance, and disease: The role of endothelial cells. *Curr Top Dev Biol.* 100: 203–232.
- Tarin JJ, Perez-Albala S, Garcia-Perez MA, Cano A. 2002. Effect of dietary supplementation with a mixture of Vitamins C and E on fertilization of tertiary butyl hydroperoxide-treated oocytes and parthenogenetic activation in the mouse. *Theriogenology.* 57(2):869-881.
- Tokmakov AA, Stefanov VE, Iwasaki T, Sato KI, Fukami Y. 2014. Calcium signaling and meiotic exit at fertilization in *Xenopus* egg. *Int J Mol Sci.* 15:18659-18676.
- Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R. 2005. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction.* 130:467-474.
- Versieren K, Heindryckx B, Lierman S, Gerris J, De Sutter P. 2010. Developmental competence of parthenogenetic mouse and human embryos after chemical or electrical activation. *Reprod Biomed Online.* 21:769-775.
- Wakai T, Vanderheyden V, Fissore RA. 2003. Ca²⁺ signaling during mammalian fertilization: requirements, players, and adaptation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:1006767.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher S. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol.* 3:E59-E64.
- Whitaker M. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev.* 86(1):25-88.
- Yamada M, Revelli JP, Eichele G, Barron M, Schwartz RJ. 2000. Expression of chick Tbx-2, Tbx-3, and Tbx-5 genes during early heart development: Evidence for BMP2 induction of Tbx2. *Dev Biol.* 228: 95–105.
- Yamagishi T, Ando K, Nakamura H. 2009. Roles of TGF- β and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. *Anat Sci Int.* 84: 77–87.
- Yaste M, Jones C, Amdani SN, Pastel S, Coward K. 2016. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution. *Hum Reprod Update.* 22(1):23-47.

Ye J, Campbell KH, Craigon J, Luck MR. 2005. Dynamic changes in meiotic progression and improvement of development competence of pig oocytes in vitro by follicle stimulating hormone and cycloheximide. *Biol Reprod.* 72:399-406.